

**Expression und subzelluläre Lokalisation
der kleinen Hitzeschockproteine α B-Crystallin und HSP27
bei kongenitalen Myopathien und neurogenen Gewebssyndromen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vorgelegt von Jens Matten
aus Dinslaken
2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. Rolf Schröder
2. Gutachter: Professor Dr. med. Albert Becker

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.10.2008

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Direktor: Professor Dr. med. Thomas Klockgether

	Seite
I. Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1. Hitzeschockproteine: Allgemeine Einführung	7
1.2. Die Familie der kleinen Hitzeschockproteine	8
1.3. αB-Crystallin: Genlokalisierung, Expression, posttranslationale Modifikationen und Funktion	8
1.4. HSP27: Genlokalisierung, Expression, posttranslationale Modifikationen und Funktion	9
1.5. αB-Crystallin und HSP27 assoziierte Erkrankungen	10
1.5.1. Mutationen des humanen αB-Crystallin Gens verursachen eine autosomal dominante Proteinaggregationsmyopathie	10
1.5.2. Mutationen des humanen HSP27 Gens verursachen eine autosomal dominante motorische Neuropathie und eine Unterform der <i>Charcot-Marie-Tooth</i> Erkrankung	11
2. Zielsetzung der Arbeit	12
3. Material und Methoden	13
3.1. Muskelpräparate	13
3.2. Reagenzien	14
3.3. Verwendete Antikörper	16
3.3.1. Primärantikörper	16
3.3.2. Sekundärantikörper	16
3.4. Geräte	17
3.5. Histologie und Histochemie	17
3.5.1. Objektträgerbeschichtung	17
3.5.2. Gefrierschnitte	17
3.6. Immunfluoreszenzmikroskopie	18
3.6.1. Allgemeine Methoden	18
3.6.2. Immunfluoreszenzmikroskopie bei Cryo Schnitten von Muskelbiopsaten	18
3.6.3. Natriumthiocyanatbehandlung der Muskelbiopsate	19
3.7. Western Blotting	20

3.7.1.	Allgemeine Methode	20
3.7.1.1.	Herstellung des Muskelhomogenisates	20
3.7.1.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	20
3.7.1.3.	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	21
3.7.1.3.1.	Prinzip des Versuches	21
3.7.1.3.2.	Durchführung des Versuches	21
3.7.1.4.	Blotting	23
3.7.1.4.1.	Prinzip des Versuches	23
3.7.1.4.2.	Semy-dry blotting	23
4.	Ergebnisse	25
4.1.	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot	25
4.1.1.	Expression und Lokalisation von αB-Crystallin in der normalen Skelettmuskulatur	25
4.1.2.	Expression und Lokalisation von HSP27 in der normalen Skelettmuskulatur	26
4.1.3.	Lokalisation und Expression von αB-Crystallin in kongenitalen Myopathien und neurogenen Gewebssyndromen	27
4.1.4.	Lokalisation und Expression von HSP27 in kongenitalen Myopathien und neurogenen Gewebssyndromen	31
5.	Diskussion	34
6.	Zusammenfassung	37
7.	Literaturverzeichnis	38
8.	Danksagung	48
9.	Lebenslauf	49

I. Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
αAC	α A-Crystallin
αBC	α B-Crystallin
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APES	3-Aminopropyltriethoxysilane
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CACNA1S	Calcium Channel, Voltage-Dependent, L Type, Alpha-1s Subunit
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>Central-Core-Myopathie</i>
CMT 2	<i>Charcot-Marie-Tooth 2</i> Erkrankung
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
Fab	Antigenbindendes Fragment
Fc	Kristallisierbares Fragment
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisoithiocyanat
FKBP12	12 kDa FK506-binding protein
HMN II	Hereditäre Motorneuronenerkrankung
HRP	Meerrettich Peroxidase
HSB1	<i>Heat shock binding protein</i>
HSE	<i>Heat shock element</i>
HSF	<i>Heat shock factor</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IF	Indirekte Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
MAPKAP-2-Kinase	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2
MCD	<i>Minicore-Myopathie</i>

N2B Domäne	Spezifische Titin Domäne im Herzmuskel
NA/ TF	<i>Neurogene Atrophie mit Targetfasern</i>
NM	<i>Nemaline-Myopathie</i>
p38MAP-Kinase	p38 mitogen-activated protein kinase
p44/42 MAP-Kinase	P44/42 mitogen-activated protein kinase
PBS	Phosphatpuffer
PBST	Phosphatpuffer+ Tween
PBST + T	Phosphatpuffer+ Tween+ Triton X
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan;
Triton X	o-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl]-deca (oxyethylen)
Tween	Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat
TXR	Texas Red
WB	Western Blot
ZASP	Z band alternatively spliced PDZ-motif protein

1. Einleitung

1.1. Hitzeschockproteine: Allgemeine Einführung

Vor mehr als vierzig Jahren wurde auf der Basis von Experimenten an Fruchtfliegen das erste Mal von Proteinen berichtet, die speziell unter Hitzeeinwirkung exprimiert werden. Dieser Eigenschaft Rechnung tragend, wurde für diese Proteine der Begriff „Hitzeschockproteine“ (HSPs) eingeführt (Tissieres et al., 1974). Im Rahmen der zahlreichen Folgestudien der letzten Jahrzehnte wurde gezeigt, dass HSPs eine evolutionsbiologische hoch konservierte Gruppe von heterogenen und multifunktionellen Proteinen darstellen, die in nahezu allen Zellen prokaryontischen und eukaryontischen Ursprungs exprimiert werden (Schlesinger, 1994). In humanen Zellen kommen fünf Hauptgruppen aus der Familie der Stressproteine vor, die entsprechend ihrem Molekulargewicht in die Familien der kleinen Hitzeschockproteine (small heat shock proteins; sHSP), der HSP60, der HSP70, der HSP90 und HSP100 unterteilt werden (Craig et al., 1994; Ellis und van der Vies, 1991; Ellis, 1990).

HSPs werden nicht nur bei Hyperthermie sondern auch bei einer Vielzahl von anderen Gewebenoxen wie Hypothermie, Hypoxie, Ischämie, Schwermetallexposition und UV-Strahlung vermehrt exprimiert (Parsell und Lindquist., 1993). Da sie eine Schutzfunktion bei verschiedenen Formen von zellulärem Stress ausüben, werden die HSPs auch als Stressproteine bezeichnet. Neben einer immunmodulatorischen Funktion (Liang und MacRay, 1997) kommt den HSPs ferner eine wesentliche Rolle in der Qualitätskontrolle von Proteinen zu (Liang und MacRae, 1997; Lindquist und Craig, 1988). HSPs besitzen hierbei eine Funktion als molekulare „Chaperone“, die anderen Proteinen bei der Faltung oder bei der Erhaltung ihrer Sekundärstruktur in physiologischen und unphysiologischen Situationen helfen (Ellis und van der Vies, 1991; Ellis, 1990). In zellulären Stresssituationen schützen die HSPs zelluläre Proteine vor einer Denaturierung oder beschleunigen den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine über das Proteasom (Ellis und van der Vies, 1991; Ellis, 1990; Head et al., 1994)

Die Induktion von HSPs wird über eine spezifische DNA Sequenz reguliert, die als *heat shock element* (HSE) bezeichnet wird (Tanguay, 1988). Ein HSE ist hierbei eine Bindungsstelle für ein spezifisches Protein, dem so genannten *heat shock transcription factor* (HSF), in der Promotorregion des jeweiligen HSP (Morimoto, 1998). In der Säugerzelle existieren zwei HSFs. HSF1 wird durch Stress, HSF2 durch Differenzierungs- und Wachstumsvorgänge induziert

(Sarge et al., 1998). Eine Inaktivierung der beiden HSFs erfolgt durch eine direkte Anbindung des *heat shock binding protein-1* (HSB1) an HSF1 bzw. HSF2 (Sarge et al., 1998).

1.2. Die Familie der kleinen Hitzeschockproteine

Die Mitglieder der sHSPs sind durch das relativ niedrige Molekulargewicht (zwischen 15 und 40 kDa) sowie das Vorkommen einer 80 bis 100 Aminosäuren langen und hoch konservierten Peptidsequenz am C-terminalen Ende gekennzeichnet (Clark und Muchowski, 2000; Golenhofen et al., 1998; Head et al., 1994). Diese sog. *α -crystallin core* Domäne ermöglicht eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen den sHSPs und die konsekutive Bildung von dynamischen, heteropolymeren Proteinkomplexen (Horwitz, 1992; MacRae, 2000; Sun und MacRae, 2005). Bedeutsam ist ferner das α B-Crystallin zusammen mit HSP27 heteropolymere Komplexe als Funktionseinheit ausbilden (Kato et al., 2002). Die klassischen und im humanen Organismus mit spezifischen Erkrankungen assoziierten sHSPs sind α B-Crystallin (α BC) und HSP27, die im Folgenden genauer vorgestellt werden (Graw, 1997; Macario und Conway, 2000).

1.3 *α B-Crystallin*: Genlokalisierung, Expression, posttranslationale Modifikationen und Funktion

α -Crystallin wurde primär in der Augenlinse von Säugetieren beschrieben, wo es circa ein Drittel des Gesamtproteingehaltes ausmacht (Groenen et al., 1994; Sax und Piatigorsky, 1994). Humanes *α -Crystallin* wird in zwei verschiedenen Isoformen gebildet, wobei die linsenspezifische *α A-Crystallin* Isoform (α AC, 20 kDa) durch ein Gen auf Chromosom 21q23 und die fast ubiquitär exprimierte *α B-Crystallin* (α BC, 22 kDa) Isoform durch ein korrespondierendes Gen auf Chromosom 11q22.3-q23 kodiert werden (Bath und Nagineni, 1989; Sax et al., 1994). Beide Isoformen weisen auf Aminosäureebene eine Sequenzhomologie von 57% auf und bilden in der Augenlinse heteropolymere Komplexe mit einem Molekulargewicht von 700–800 kDa (Groenen et al., 1994). *α A-Crystallin* und *α B-Crystallin* liegen in der Linse bis zu 30% in phosphorylierter Form vor (Kantorow et al., 1995). Für *α A-Crystallin* wurde die Aminosäure Serin an Position 122 als Phosphorylierungsstelle kartiert. *α B-Crystallin* besitzt dagegen drei Phosphorylierungsstellen, die mit den Serin-Positionen Ser-19, -45 und -59 identisch sind (Kato et al., 2002). Die Phosphorylierung ist ein irreversibler cAMP (zyklisches Adenosin-monophosphat) abhängiger Prozess (Kato et al., 2002). Während der Mitose kommt es zu einer Hochregulierung des an Ser-19 und Ser-45 phosphorylierten Proteins. Die verantwortlichen

Kinasen für Ser-45 und Ser-59 sind die p44/42 MAP-Kinase und MAPKAP-Kinase 2 (Kato et al., 2002). Die Kinase, die an Ser-19 phosphoryliert, ist bislang nicht identifiziert worden, da es sich vermutlich um ein sehr instabiles Molekül handelt (van den Ijssel et al., 1998).

1.4 HSP27: Genlokalisierung, Expression, posttranslationale Modifikationen und Funktion

Das HSP27 kodierende Gen liegt beim Menschen auf dem Chromosom 7q11-q21 (Gaestel et al., 1993; Lindquist und Craig, 1988). HSP27 wird in einer Vielzahl von humanen Zellen und Gewebetypen exprimiert. Eine besonders hohe Expressionsrate ließ sich in der Haut sowie der Skelett- und Herzmuskulatur nachweisen (Welsh und Gaestel, 1998). In der Zelle liegt das Protein in oligomeren Komplexen mit einem Molekulargewicht von bis zu 1MDa vor (Welsh und Gaestel, 1998). Für das humane HSP27 sind drei Phosphorylierungsstellen an Position Ser-15, -78 und -82 bekannt (Landry et al., 1992). HSP27 wird über eine MAPKAP-2-Kinase phosphoryliert. Unter Stress verläuft die Phosphorylierung über Stimulation der p38MAP-Kinase Kaskade, die die MAPKAP-Kinase 2 und 3 aktiviert und so HSP27 phosphoryliert (Ehrnsperger et al., 1997; Landry et al., 1992).

Eine Überexpression hat Einfluss auf die Organisation der Aktin-Mikrofilamente (Lavoie et al., 1993). HSP27 stabilisiert das Aktin-Zytoskelett in Zellen, die vermehrtem oxidativem Stress oder/ und Hitze Schock ausgesetzt werden (Benndorf et al., 1994; Perng et al., 1994). Des weiteren wird die relative Resistenz der Zelle gegenüber toxischen Agenzien erhöht und es verhindert ebenso die Aggregation von denaturierten Proteinen (Huot et al., 1991; Lavoie et al., 1993; Mehlen et al., 1995). HSP27 wird nach Zellkontakt, Exposition gegenüber verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, Zytokinen, toxischen Agenzien, Hitze und oxidativem Stress phosphoryliert und führt auf diese Weise konsekutiv zu einer Aktivierung der Aktin Polymerisation (Kato et al., 1994). Die Expression dieses 27 kDa großen Proteins wird auf zwei unterschiedlichen Stufen, der Transkription und der Translation, reguliert. Der Transkriptionsvorgang wird hierbei durch den Einfluss von Östrogen und/ oder Gewebenoxen gesteigert. Die translationale Kontrolle der HSP27 Expression ist hingegen bislang nicht hinreichend geklärt (Gurley und Key, 1991). Ferner konnte gezeigt werden, dass HSP27 eines der Hauptpolypeptide ist, das als Antwort auf eine Steroidhormonexposition exprimiert wird (Ciocca und Luque, 1991; Fuqua et al., 1989).

1.5. α B-Crystallin und HSP27 assoziierte Erkrankungen

1.5.1. Mutationen des humanen α B-Crystallin Gens verursachen eine autosomal dominante Proteinaggregationsmyopathie

Im Jahr 1998 publizierten Vicart und Mitarbeiter erstmalig eine pathogene Mutation des α BC Gens auf Chromosom 11q21-23, die in einer französischen Familie entdeckt wurde (Vicart et al., 1998). Mutationsträger dieser Familie erkrankten hierbei an einer progressiven Myopathie, die morphologisch durch eine pathologische Akkumulation von α BC und dem Intermediärfilament (IF) Desmin gekennzeichnet ist. Als weiteres Merkmal der Erkrankung zeigte ein Teil der betroffenen Familienmitglieder bilaterale Katarakte (Vicart et al., 1998). Im Jahr 2003 wurden zwei weitere Fälle mit pathogenen α BC Mutationen beschrieben, die klinisch ebenfalls eine progressive Myopathie aufwiesen. Kataraktformationen ließen sich in diesen Fällen, im Gegensatz zu der französischen Familie, jedoch nicht nachweisen (Selcen et al., 2003).

Ferner wurde im Jahr 2006 ein sporadischer Erkrankungsfall mit einer, auf eine pathogene α BC Mutation zurückzuführenden, dilatativen Kardiomyopathie (DCM) beschrieben (Inagaki et al., 2006).

Die in der französischen Familie beschriebene R120G *missense* Mutation, die zu einem Austausch der Aminosäure (AS) Arginin zu Glycin im Codon 120 führt, wurde in molekulargenetischen Experimenten genauer charakterisiert (Ito et al., 2003). Die auf der Basis von Transfektionsstudien und kristallografischen Untersuchungen erzielten Ergebnisse sprechen hierbei dafür, dass der Aminosäureaustausch zu einer mangelnden Ausbildung von β -Faltblattformationen und einer Konformationsänderung innerhalb des hydrophoben Zentrums von α BC führt (Raman und Rao, 1994). Dies bedingt eine Destabilisierung der tertiären und quartären Strukturen von α BC, die konsekutiv eine gestörte Interaktion mit dem IF Desmin bewirkt (Bova et al., 1999; Nedellec et al., 2002). Als Konsequenz ließ sich in Transfektionsstudien an Muskelzellen zeigen, dass es zu einer fehlerhaften Ausbildung des intermyofibrillären Desminzytoskelettes innerhalb der quergestreiften Muskelzelle und konsekutiv zur Ausbildung von α BC- und Desmin-positiven Aggregaten kommt (Vicart et al., 1998). Bei der oben erwähnten α BC assoziierten dilatativen Kardiomyopathie wurde ein Austausch der AS Arginin durch Histidin an Codon 157 (Arg157His) beobachtet. Als pathogener Defekt dieser Mutation

wurde eine abgeschwächte Bindungsfähigkeit des mutierten α BC an die herzmuskelspezifische N2B Domäne des sarkomerischen Riesenproteins Titin postuliert (Inagaki et al., 2006).

Über α B-Crystallinopathien hinaus wurden auch pathogene Mutationen im α A-Crystallin-Gen beschrieben (z.B. Punktmutation R116G), die zu einer autosomal dominanten Form der kongenitalen Kataraktbildung führen (Sun und MacRae, 2005; Welsh und Gaestel, 1998).

Wenngleich die vorliegenden Untersuchungen auf eine durch α BC induzierte Funktionsstörung mit spezifischen Interaktionspartnern hinweisen, ist die genaue molekulare Pathogenese der Skelett- bzw Herzmuskel assoziierten Struktur- und Funktionsstörung bei diesen Erkrankungen unklar (Atomi et al., 1991; Bennardini et al., 1992; Wanschit et al., 2002).

1.5.2. Mutationen des humanen HSP27 Gens verursachen eine autosomal dominate motorische Neuropathie und eine Unterform der *Charcot-Marie-Tooth* Erkrankung

Mutationen des humanen HSP27 führen zu einer Unterform der neuronalen Muskelatrophie vom Typ *Charcot-Marie-Tooth* (CMT2) und zu einer Unterform der hereditären distalen Motorneuropathie vom Typ II (HMN II) (Evgrafov et al., 2004).

Klinisch äußern sich diese Formen der hereditären Motorneuropathien mit einer progressiven symmetrischen Schwäche und Atrophie der distalen Gliedermuskulatur. Zusätzlich haben die Patienten meist abgeschwächte oder fehlende Sehnenreflexe und bei der CMT2 milde bis moderat ausgeprägte distale sensorische Funktionsstörungen. Der Krankheitsbeginn liegt meist zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr (Evgrafov et al., 2004).

Die erste pathogene HSP27 Mutation wurde bei einer russischen Familie beschrieben, die klinisch an einer autosomal dominanten Form der CMT2 erkrankt war. Es konnte eine Mutation auf Chromsom 7q11-q21 identifiziert werden. Nach Sequenzierung des entsprechenden Genabschnittes für HSP27, fand sich eine S135F *missense* Mutation im Exon 2 des entsprechenden Genlocus (Evgrafov et al., 2004). Im Folgezeitraum sind andere Familien mit ähnlichen Krankheitsbildern untersucht worden. Bei sechs nicht untereinander verwandten Familien aus unterschiedlichen Teilen Europas, die an CMT2 oder HMN II litten, konnten fünf weitere Mutationen im entsprechenden Gen gefunden werden. Transfektionsstudien mit HSP27 Mutanten an neuronalen Zellen ergaben Hinweise auf eine reduzierte Viabilität dieser Zellen, die in vivo verantwortlich gemacht wird für die frühzeitliche axonale Degeneration der Nervenzellen (Evgrafov et al., 2004).

2. Zielsetzung der Arbeit

Die Beobachtung, dass α BC Mutationen zu einer autosomal dominanten myofibrillären Myopathie führen, deutet klar darauf hin, dass α BC eine essentielle Funktion in der humanen Skelettmuskulatur einnimmt. Die weiteren Vorbefunde, dass α BC zusammen mit HSP27 heteropolymere Komplexe als Funktionseinheit ausbilden, deuten auch auf eine funktionell bedeutsame Rolle von HSP27 in der quergestreiften Muskulatur hin. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, deren experimenteller Teil im Jahr 2000 durchgeführt wurde, sollte die Expression und subzelluläre Lokalisation von α BC und HSP27 in verschiedenen Formen kongenitaler Myopathien und neurogenen Gewebssyndromen untersucht werden. In Analogie zu der α BC-Myopathie weisen die verschiedenen kongenitalen Myopathien und neurogenen Gewebssyndrome Störungen der myofibrillären Architektur und zum Teil auch pathologische zytoplasmatische Proteinaggregate auf. Ziel war hierbei die Beantwortung der Frage, ob die verschiedenen Krankheitsentitäten hier im Vergleich zur normalen humanen Skelettmuskulatur ein abweichendes α BC und HSP27 Anfärbemuster bzw. ein abweichendes Proteinexpressionsmuster aufweisen. Entsprechende Untersuchungen lagen zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit nicht vor.

3. Material und Methoden

3.1 Muskelpräparate

Das entnommene Skelettmuskelgewebe stammte von 19 Patienten, die an der Neurologischen Universitätsklinik Bonn behandelt wurden. Diese hatten sich zur Abklärung einer fraglichen neuromuskulären Erkrankung einer Biopsie unterzogen. Bei diesen Patienten konnte eine der folgenden neuromuskulären Erkrankungen diagnostiziert werden: *Central-Core-Myopathie* (CCD, n=5), *Minicore-Myopathie* (MCD, n=1), *Nemaline-Myopathie* (NM, n=5), *Myopathie mit tubulären Aggregaten* (MTA, n=3) und *neurogene Atrophie mit multiplen Targetfasern* (NA/TF, n=5). Die Diagnosen basierten auf klinischen, elektrophysiologischen und histopathologischen Kriterien. Die histologischen Kriterien für *Core*-Strukturen beinhalteten ein Fehlen von Enzymen mit oxidativer Reaktion und eine Prädilektion für Typ I Fasern. Kriterien für so genannte *Targetfasern* waren erstens, eine zentrale Zone ohne enzymatische Aktivität, zweitens, eine Intermediärzone mit erhöhter Enzymaktivität und drittens eine periphere Zone mit mittlerer Enzymaktivität (Dubowitz et al., 1985). Die Muskelbiopsate von weiteren drei Patienten dienten nach Ausschluss einer Muskelerkrankung durch klinische, elektromyographische, biochemische und histologische Untersuchungen für diese Untersuchungen, als Beispiel für normales, adultes Skelettmuskelgewebe. Das Muskelgewebe wurde jeweils im Rahmen der diagnostischen Biopsie aus den *Mm. biceps brachii*, *gastrocnemius* bzw. *quadriceps femoris* entnommen. Die Eingriffe wurden in Lokalanästhesie in der Neurochirurgischen Universitätsklinik Bonn durchgeführt. Das jeweils entnommene Muskelstück wurde in einen Teil für die histologische Aufarbeitung, einen Teil für die biochemische Analyse und einen weiteren Teil für die ultrastrukturelle Analyse unterteilt. Die Gewebestücke für die histologischen Analysen wurden mit Tissue Tek[®] (Fa. QIAGEN, Deutschland) auf einem Korkplättchen befestigt und anschließend in mit flüssigem Stickstoff auf ca. -179° C gekühltem Isopentan tief gefroren (Schubert et al., 1988). Wichtig war es dabei auf den Faserverlauf zu achten, der in senkrechter Ausrichtung zu dem Korkplättchen sein sollte, um später Querschnittspräparate anfertigen zu können. Die verbliebenen Proben für die biochemische Untersuchung wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2. Reagenzien

10x Elektrophoresepuffer nach Laemmli	25 mM TRIS 192 mM Glycerin 0,1 % (w/v) SDS
2% APES-Lösung	3-Aminopropyltriethoxysilane
30 % AA	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) BIS
5x SDS Probenpuffer	5 % SDS 40 mM DTT 5 mM EDTA 50 mM NaP, pH Wert 6.8 15 % Glycerin und einer Spatelspitze Bromphenolblau gelöst in 100 ml Laemmli Puffer
Ammoniumpersulfatlösung.	10 % (w/v) APS
Anodenpuffer 1	300 mM TRIS 20 % Methanol ad 500 ml Aquadest. pH 10,4
Anodenpuffer 2	25 mM TRIS 20 % Methanol ad 500 ml Aquadest. pH 10,4
Azeton	reinst, für Analysen
Blockierlsösung	4 % Magermilchpulver in PBST gelöst
Bradford-Lösung	50 mg Coomassie Brilliant Blau G-250 25 ml 95%iger Ethanol 50 ml konzentrierte Phosphorsäure auf 100 ml mit Wasser auffüllen
DAPCO®	Triethylendiamin (1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan)

Eindeckmedium	Glyzerin 78 %, Natriumphosphat 6 mmol/L, Kaliumphosphat 1,6 mmol/L, Natriumchlorid 60 mmol/L, Natriumazid 0,95 g/L
Kathodenpuffer	40 mM 6-Amino-n-Hexansäure 20 % Methanol ad 500 ml Aquadest. pH 7,6
L-Puffer	1,5 M TRIS HCl, pH 8,8 0,8 % (w/v) SDS
Methanol	Reinst, für Analysen
M-Puffer	0,5 M TRIS HCl, pH 6,8 0,8 % (w/v) SDS
Natriumthiocyanat	1 M NaSCN in PBS, pH 7,4
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4
PBST	1x PBS 0,1 % Tween 20
PBST + T	1x PBS 0,1 % Tween 20 1 % Triton X 100
TEMED	99 % TEMED, (N,N,N',N'-tetramethyl- ethyldiamin)

3.3. Verwendete Antikörper

3.3.1. Primärantikörper

Als Primärantikörper wurden monoklonale und polyklonale Antikörper (Ak) gegen α BC und HSP27 eingesetzt. Zur immunfluoreszenzchemischen Darstellung von Desmin und Aktin wurden zusätzlich monoklonale Ak verwendet (siehe Tabelle 1).

3.3.2. Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper zur Darstellung der einzelnen Zielproteine waren für die Western Blot Analysen mit Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase; HRP) konjugiert. Für die immunhistochemischen Analysen wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen (Texas red, TXR, rot und Fluoreszeinisothiocyanat, FITC, grün) konjugierte Ak eingesetzt.

Tab. 1 **Übersicht der eingesetzten Antikörper**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Polyklonaler anti- α BC-Ak (Kaninchen)	1: 200 / 1: 2000 IF ^x / WB ^{xx}	Chemicon, USA
Monoklonaler anti-HSP27-Ak (Maus)	1: 100 / 1: 500 IF/ WB	StressGen, Kanada
Monoklonaler anti-Desmin-Ak (Maus)	1: 300 IF	DAKO, Dänemark
Monoklonaler anti-Aktin-Ak (Maus)	1: 50 IF	Sigma Aldrich, Deutschland
FITC/ TXR-konjugierter sek. Ak	1: 100 IF	Sigma Aldrich, Deutschland
HRP-konjugierter sek. Ak	1: 30000 WB	Dianova, Deutschland

^x IF= indirekte Immunfluoreszenz

^{xx} WB= Western Blot

3.4. Geräte

Cryomikrotom (Firma Leica, Deutschland)

Biorad Western Blot Einheit (Firma Bio-Rad, München)

Mikroskop Othoplan Typ 307-072.028, 50W (Firma Leitz, Deutschland)

Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E 800 (Firma Nikon, Deutschland)

Ultra Turrax® (Firma Roth, Deutschland)

Mini Elektrophorese Kammer Mini Protean II® (Firma Bio-Rad, München)

Spannungsquelle Pharmacia EPS 600 (Firma Biotech, San Francisco, USA)

Ultrazentrifuge Sorvall® WX (Firma Thermo Fisher Scientific, Deutschland)

3.5. Histologie und Histochemie

3.5.1. Objektträgerbeschichtung

Um einer Ablösung der Schnitte während der Immunfärbung entgegen zu wirken, wurden unbehandelte Objektträger für wenige Sekunden in Methanol getaucht und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger in 2%tige APES-Lösung (3-Aminopropyltriethoxysilane) überführt. Dieser Vorgang nimmt etwa 5 sec. in Anspruch. Danach wurden die so vorbehandelten Objektträger mit destilliertem Wasser gewaschen und in einem Wärmeschrank bei 37°C über Nacht getrocknet.

3.5.2. Gefrierschnitte

Mit Hilfe eines Cryomikrotoms wurden von den unfixierten und tiefgefrorenen Biopsien Serienschnitte mit einer Dicke von 6 µm angefertigt und auf die mit APES beschichteten Objektträger aufgezogen. Die Muskelschnitte wurden dann für 10 min. in Azeton bei -20°C fixiert und anschließend für eine halbe Stunde luftgetrocknet.

3.6. Immunfluoreszenzmikroskopie

3.6.1. Allgemeine Methode

In der Immunhistochemie werden ganz überwiegend Antikörper (Ak) der Immunglobulin G (IgG) Klasse und ihrer Subklassen (IgG₁-IgG₄) eingesetzt. IgG Ak besitzen zwei Antigenbindungsstellen (Fab= Antigen bindendes Fragment) sowie ein drittes Fragment, dass kein Antigen (Ag) binden kann (Fc= kristallisierbares Fragment). Die Ak werden aus unterschiedlichen Tierspezies extrahiert. Sie binden an eine spezifische Regionen des zu untersuchenden Proteins, dass einen bestimmten Bereich dieses Proteins, das Epitop, in seiner jeweiligen Tertiärstruktur darstellt. Es werden zwei Typen von Antikörpern unterschieden, polyklonale Ak und monoklonale Ak. Jeder dieser Ak hat Vor- und Nachteile, je nach Einsatzbereich. Polyklonale Ak sind gegen verschiedene Epitope eines Proteins gerichtet und können diese häufig auch nach einer vollständigen Denaturierung des Proteins noch detektieren. Monoklonale Ak richten sich nur gegen ein bestimmtes Epitop des Proteins. Nach Denaturierung dieses Proteins kann der Ak u.U. nicht mehr an das spezifische Epitop binden, da die Struktur während des Entfaltungsprozesses nicht mehr erhalten sein kann. Bindet nun ein Ak an das spezifische Ag, wird in einem zweiten Schritt ein sekundärer Ak eingesetzt, der nun gegen das Fc Fragment des ersten Ak gerichtet ist. Dieser zweite Ak ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder Enzym konjugiert, der durch Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt wird und dann je nach Fluoreszenzfarbstoff ein Licht bestimmter Wellenlänge emittiert bzw. über eine spezifische Substratzugabe zu einer Farbreaktion führt.

Mit dieser Methode ist ein spezifischer Proteinnachweis in histologischen Präparaten möglich.

3.6.2. Immunfluoreszenzmikroskopie bei Cryoschnitten von Muskelbiopsaten

Von den Muskelbiopsaten wurden 6µm dicke Schnitte mit einem Cryomikrotom angefertigt und für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung auf einen Objektträger überführt (2-3 Schnitte/ Objektträger). Die Schnittpräparate wurden dann für 10 min. in reiner Azetonlösung bei -20°C fixiert und anschließend bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet. Danach wurden die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift (DAKO-Pen[®], DAKO A/S Glostrup, Dänemark) umkreist, um ein Ab- und Ineinanderlaufen der Inkubationslösungen zu vermeiden (Schröder et al., 1997). Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Objektträger mit fötalem Kälberserum (FCS)

für ca. 30 min. in einem Wärmeschrank bei 37°C inkubiert und anschließend mit PBS (3x 5 min.) gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit dem primären Ak für 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Objektträger erneut in einer Küvette mit PBS (3x 5 min.) gewaschen und mit dem sekundären Ak unter den gleichen Bedingungen inkubiert und gewaschen. Die so präparierten Objektträger wurden mit Deckgläsern eingedeckelt. In dem Eindeckmedium war zusätzlich ein Antibleichmittel enthalten (DABCO®, Firma Sigma), da der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff relativ instabil ist und sonst ein mehrmaliges betrachten des Objektträgers nicht mehr möglich gewesen wäre (Fischer et al., 2002).

Die untersuchten Präparate wurden zu Dokumentationszwecken digital fotografiert.

3.6.3. Natriumthiocyanatbehandlung der Muskelbiopsate

Zur Entfernung von Aktin aus den Muskelbiopsaten wurden die nicht fixierten Cryoschnitte für 15 min. bei RT mit Natriumthiocyanat (1 M NaSCN in PBS, pH 7,4) inkubiert (Fischer et al., 2002).

3.7. Western Blotting

3.7.1. Allgemeine Methode

3.7.1.1. Herstellung des Muskelhomogenisates

Das tief gefrorene Muskelgewebe wurde mit 1ml des Probenpuffer, der vorher bei 95°C für ca. 2 min. erhitzt wurde, für ca. 2 min. mit einem Ultra Turrax®, unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (Proteaseinhibitor Cocktail Tabletten, Boehringer/Roche, Complete Mini) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat für ca. 15 min. bei einer Temperatur von 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge bei 20.000 x G für ca. 20 min. wurde der Überstand erneut für 2-3 min. bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben direkt auf ein Gel aufgetragen oder bei -20°C weggefroren. Der hier eingesetzte Probenpuffer bestand aus 5 % SDS, 40 mM DTT, 5 mM EDTA, 50 mM NaP bei einem pH Wert von 6.8, 15 % Glycerin und einer Spatelspitze Bromphenolblau gelöst in 100 ml Laemmli Puffer (Laemmli, 1970; Schröder et al., 1997).

3.7.1.2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Das Farbreagens (Coomassie Brilliant Blue G250®, Firma Roth) wurde im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt und durch ein doppeltes Faltenfilter (Schleicher & Schuell) abfiltriert. Anschließend wurde die BSA-Standard-Lösung (Bovine Serum Albumin Standard-Lsg.) aufgetaut und mit einem Vortexer gemischt. Für die Erstellung der Eichkurve wurden folgende Volumina in Makroküvetten pipettiert: 0µl, 20µl, 40µl, 60µl, 80µl und 100µl BSA-Lösung und mit PBS auf je 100µl aufgefüllt. Das zu untersuchende Muskelhomogenisat wurde in PBS resuspendiert und je 100µl in Makroküvetten gefüllt. Je 1ml filtrierte Farbreagens wurde zu dem BSA-Standard und Proben zugegeben, gut gemischt und 5 min stehen gelassen. Die optische Dichte wurde photometrisch bei 595nm bestimmt. Aus den Messdaten der Standards konnte eine Eichgerade erstellt und die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden. Mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert ergab sich die tatsächliche Proteinkonzentration der Probe (Bradford et al., 1976). Die Proteinkonzentration wurde über folgende Formel berechnet:

$$\frac{\text{Extinktion} \times \text{Bradfordfaktor}}{\text{Volumen der Probe} \times 0,1} = \text{Proteinkonzentration}$$

Der Bradfordfaktor wird mit Hilfe einer BSA-Eichkurve ermittelt.

3.7.1.3. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3.7.1.3.1. Prinzip des Versuche

Proteine dissoziieren durch Zugabe von SDS (Sodium dodecyl sulfat), einem starken anionischen Detergenz, und werden durch das reduzierend wirkende β -Mercaptoethanol und unter Hitzeeinwirkung entfaltet. Es bilden sich SDS/ Polypeptid Komplexe mit einer negativen Ladung. Die Bindung von SDS an Polypeptide ist proportional zu dem jeweiligen Molekulargewicht, aber unabhängig von der Primärstruktur des Moleküls. Diese Komplexe können nun bei Anlage eines elektrischen Feldes in dem Polyacrylamid Gel in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes (MG) wandern. Bei gleichzeitiger Auftragung eines Marker-Proteingemisches, das ein Gemisch aus definierten Proteinen darstellt, kann man nun anhand des MG das zu untersuchende Protein auf dem Gel an Hand seiner Größe charakterisieren. Die SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese läuft in einem diskontinuierlichen Puffersystem, bestehend aus Sammel- und Trenngel mit jeweils unterschiedlichem pH-Wert und Ionen-Konzentration. Das Polyacrylamid Gel besteht aus Ketten von polymerisiertem Acrylamid, die über sogenannte *Cross Linker*, N,N'-Methylenbisacrylamid, vernetzt worden sind. Die vernetzten Bisacrylamide verleihen dem Gel eine gewisse Festigkeit und Stabilität. Das Acrylamid formt dabei Poren in das Gel, wobei der Durchmesser dieser Poren durch die Acrylamid Konzentration bestimmt wird. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin) und Ammoniumpersulfat (APS), sind zwei weitere Substanzen die die Polymerisation des Polyacrylamid Gels beschleunigen. Hierbei gibt Ammoniumpersulfat freie Radikale ab, die über TEMED katalysiert werden und ohne die Acrylamid nicht polymerisiert werden kann. In Abhängigkeit der zu untersuchenden Proteine wählt man dann ein Gel mit entsprechender Porengröße aus (Görg et al., 1995).

3.7.1.3.2. Durchführung des Versuches

Für die Elektrophoresen in der vorliegenden Arbeit wurden 12,5%tige SDS-PAGE Trenngele und eine Mini Elektrophorese Kammer (Mini Protean II, Bio-Rad, München) verwendet. Das Trenn- und das Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung: Acrylamid (Konzentration 37%, 5:1) in 1,5 M Tris HCl (pH 8,8) bzw. 0,5 M Tris HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS, 10 % APS und TEMED (im Verhältnis 2:1 bzw. 1:4). Das Trenngel wurde zum Glätten nach dem Gießen mit Isopropanol bedeckt. Nach Aushärtung des Gels wurde das Isopropanol mit Aqua dest. gründlich

ausgewaschen, da sonst das Sammelgel nicht vernünftig aushärten würde. Nun wurde die Lösung des Sammelgels über das Trenngel geschichtet und anschliessend ein Kamm (10er Kamm) für die Probestaschen in das Sammelgel gesteckt, der nach Aushärtung entfernt wurde. Die Elektrophoresekammer und die Probestaschen wurden dann mit Laemmli Puffer (1x konzentriert) befüllt. Das in Probenpuffer suspendierte Muskelhomogenisat wurde vor dem Auftragen kurz im Wasserbad bei 95°C erhitzt. Nach im Vorfeld durchgeführter Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte dann die weitere Probenauftragung. Pro Gelspur wurden hierbei jeweils ca. 30µg des Gesamtproteinextraktes aufgetragen. Zusätzlich wurde eine oder mehrere Taschen mit der Größenmarkersuspension beladen (SDS PAGE Molecular weight standards, Broad Range, BIO RAD). An die Kammer wurde eine Stromstärke von 10 mA pro laufendem Gel angelegt, bis die Proben durch das Sammelgel gelaufen waren. Für das Trenngel wurde eine Stromstärke von 20 mA pro Gel angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, als die an vorderster Front laufende erste Bande der Größenmarkersuspension aus dem Trenngel ausgewandert war (Fischer et al., 2002).

3.7.1.4. Blotting

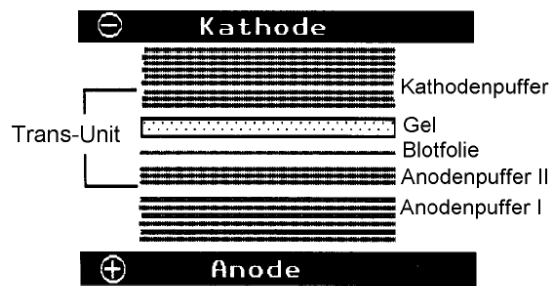
3.7.1.4.1. Prinzip des Versuches

Die in der SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine werden in einem elektrisch angelegten Feld auf eine PVDF[®] Membran (Immobilon-P, Millipore) oder eine Nitrocellulose Membran (HYBOND C, Amersham) übertragen. Der Vorteil einer PVDF[®] Membran ist, dass sie sehr gut für das HRP Detektionssystem geeignet ist, mit Gel Code[®] (Pierce Biotechnology, Rockford) anfärbbar ist und Mehrfachinkubationen möglich macht. Die zu detektierenden Proteine können so mit immunologischen Verfahren sichtbar gemacht werden. Eine Größenzuordnung des jeweils detektierten Proteins gelingt hierbei durch den Bezug zu einem mitgeblotteten Molekulargewichtsmarker.

3.7.1.4.2. Semi-dry blotting

Die *semi-dry blotting* Methode ermöglicht einen schnelleren Proteintransfer bei einer kleineren Apparaturgröße. Die Arbeiten können bei RT durchgeführt werden und man kann bis zu sechs Gele gleichzeitig blotten. Für den Elektrotransfer (diskontinuierliches Puffersystem) wurden das Filterpapier und die PVDF[®] Membran auf die jeweilige Gelgröße zurecht geschnitten. Die Elektrodenfläche der Transferzelle (Bio Rad) wurde initial mit Aqua dest. gereinigt. Es wurden drei Schalen mit jeweils Anodenpuffer1, Anodenpuffer2 und Kathodenpuffer befüllt. Das zu blottende Gel wurde für ca. 5 min. zum Äquilibrieren in Anodenpuffer2 gelegt. Zwei Filterpapiere wurden in Anodenpuffer1 getränkt und auf der Anode (untere Elektrode der Transferzelle) gestapelt und mit einer Pasteurpipette ausgestrichen, um vorhandene Luftblasen zu entfernen. Als nächstes wurde die PVDF[®] Membran in Anodenpuffer2 getränkt und auf den Stapel gelegt. Danach wurde das Gel auf die Membran gebracht und erneut ausgestrichen um Luftblasen zu eliminieren. Zum Schluß wurden drei Filterpapiere, die vorher in Kathodenpuffer getränkt worden sind, auf das Gel gestapelt (siehe Skizze). Zum Schluß wurde der Deckel, der die Kathode der Transferzelle darstellt, aufgesetzt und die Transferzelle an die Spannungsquelle (Pharmacia EPS 600) angeschlossen. Die anzulegende Stromstärke (I) lässt sich über folgende Formel berechnen: $I \text{ (mA)} = \text{Gelfläche (cm}^2\text{)} \times 0,8$. Wobei die Spannung U (V) < 25 V sein sollte. Die Laufzeit betrug ca 90 min. bei einer Stromstärke von ~ 54 mA. Nach Beendigung der Laufzeit wurde die Membran kurz mit PBS/ Milchpulver inkubiert um eventuell auftretende

unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran für 30 min. bei RT mit dem jeweiligen Primär Ak inkubiert und anschließend für 3x 10 min. mit PBS/ Tween gewaschen. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte dann die Inkubation mit einem konjugierten Sekundär Ak (30 min. RT) gefolgt von neuen Waschschritten (3x 10 min. PBS Puffer). Zum Abschluß erfolgte dann eine etwa 1 min. Inkubation mit der *enhanced chemiluminescence* (ECL[®]), Detektionslösung (Pierce Biotechnology, Rockford). Die so behandelte Membran wurde dann nach Einschweißung in eine Plastikfolie zusammen mit einem unbelichteten Film in der Dunkelkammer in eine Filmkassette gelegt. Nach einer ca. 1 bis 2 min. Exposition des Films erfolgte dann die entsprechende Filmentwicklung (Fischer et al., 2002).



Skizze:

Aufbau und Anordnung der Filterpapiere, PVDF[®]-Membran und des Gels bei der hier eingesetzten *semi-dry-blotting* Methode (entnommen aus Görg et al., 1995).

4. Ergebnisse

4.1. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot

4.1.1. Expression und Lokalisation von α B-Crystallin in der normalen Skelettmuskulatur

Die Expression und Lokalisation von α BC in der normalen humanen Skelettmuskulatur wurde mittels Western blotting und indirekter Immunfluoreszenz Analyse untersucht. Unter Verwendung des polyklonalen Kaninchen anti- α BC Antikörpers zeigt die Western Blot Analyse von Gesamtproteinextrakten aus adulter normaler humaner Skelettmuskulatur eine spezifische Reaktion mit einer singulären Bande in einer Größe von ca. 22 kDa, die dem errechneten Molekulargewicht von α BC entspricht (Abb. 1). Indirekte Immunfluoreszenz Analysen an Querschnitten von normaler Skelettmuskulatur zeigten ein schwaches zytoplasmatisches Anfärbemuster der Muskelfasern (Abb. 2A).

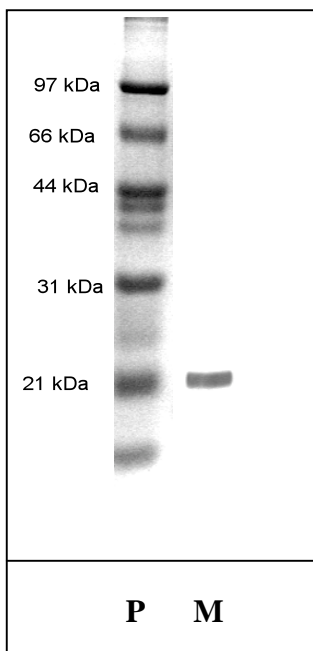


Abb. 1:

α BC-Western Blot Analyse an Gesamtproteinextrakten aus normalem, adulten Skelettmuskel. Beachte die isolierte Detektion einer α BC Bande in Höhe von 22 kDa (P= Proteinmarker, M=Muskelextrakt)

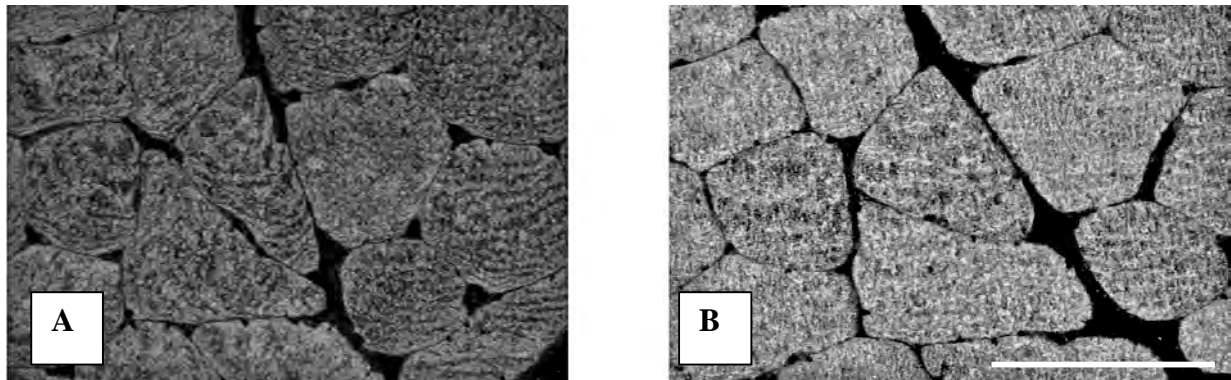


Abb. 2:

Immunfluoreszenz Analysen von normaler humaner Skelettmuskulatur mit Antikörpern gegen α BC (A) und HSP27 (B). Beachte das zytoplasmatische Reaktionsmuster bei beiden Immunfärbungen. Skalierungsbalken = 100 μ m.

4.1.2. Expression und Lokalisation von HSP27 in der normalen Skelettmuskulatur

Es wurde die Expression und Lokalisation von HSP27 in der normalen humanen Skelettmuskulatur mittels Western blotting und indirekter Immunfluoreszenz Analyse untersucht. Durch den Einsatz des monoklonalen anti-HSP27 Antikörpers zeigte sich in der Western Blot Analyse von Gesamtmuskelextrakt aus adulter humaner Skelettmuskulatur eine singuläre Bande in der Höhe von ca. 27 kDa, die dem Molekulargewicht von HSP27 entspricht (Abb. 3). In der indirekten Immunfluoreszenz Analyse an Muskelfaserquerschnitten zeigte sich unter Verwendung eines monoklonalen Maus anti-HSP27 Antikörpers ein deutlich ausgeprägtes zytoplasmatisches Färbungsmuster (Abb. 2B).

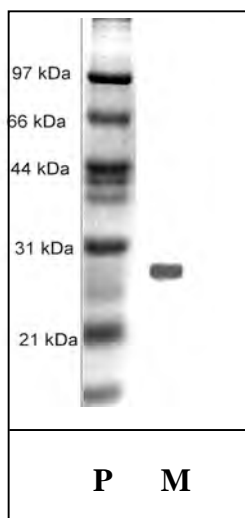


Abb. 3:

HSP27 Western Blot Analyse an Gesamtproteinextrakten aus normaler adulter Skelettmuskel. Beachte die isolierte Detektion einer HSP27 entsprechenden Bande mit einem Molekulargewicht von 27 kDa.. (P=Proteinmarker, M=Muskelextrakt)

4.1.3. Lokalisation und Expression von α BC-Crystallin in kongenitalen Myopathien und neurogenen Gewebssyndromen

Mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western blotting wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation von α BC bei insgesamt 19 Muskelbiopsien von Patienten mit kongenitalen Myopathien (*Central-Core-Myopathie*, n = 5; *Minicore-Myopathie*, n = 1; *Nemaline-Myopathie*, n = 5; *Myopathie mit tubulären Aggregaten*, n = 3; *Neurogene Atrophie mit Targetfasern*, n = 5) untersucht. In Analogie zu den Befunden in der normalen humanen Skelettmuskulatur zeigte sich eine schwache α BC positive Anfärbung des Zytoplasmas der quer angeschnittenen Muskelfasern bei allen in dieser Arbeit untersuchten Krankheitsentitäten. In der Muskelbiopsie von dem Patienten mit der *Minicore-Myopathie* (Abb. 4A) sowie in drei der fünf Muskelbiopsien von den Patienten mit *Central-Core-Myopathie* (Abb. 5A) ließ sich jedoch zusätzlich eine deutlich verstärkte α BC Immunreaktion im Bereich der *Core* Läsionen dokumentieren.

Eine deutlich verstärkte Immunreaktion innerhalb der *Minicore* bzw. *Central-Core* Läsionen ließ sich in diesen Gewebeproben auch mit Antikörpern gegen Desmin (Abb. 4C, 5C) und Aktin nachweisen (Abb. 8A, 9A).

In zwei der fünf *Central-Core-Myopathien* ließ sich hingegen nur eine schwache α BC -, Desmin - und Aktin Immunreaktion innerhalb der *Core* Läsionen dokumentieren. Im Gegensatz hierzu zeigten *Nemaline Körper* bzw. *tubuläre Aggregate* keine positive α BC -, Desmin - oder Aktin - Immunreaktion. In einem weiteren Schritt wurde bei insgesamt fünf neurogenen Gewebssyndromen, die histologisch multiple *Targetfasern* aufwiesen, eine α BC Immunfärbung durchgeführt. In Analogie zu den Befunden in den *Core-Myopathien*, ließ sich auch in allen untersuchten neurogenen Gewebssyndromen eine deutlich verstärkte α BC -, Desmin - und Aktin -Immunreaktion der *Target* Läsionen dokumentieren (Abb. 6A, 6C und 10A).

Als einziger reproduzierbarer Unterschied im Färbeverhalten der genannten drei Antikörper bei *Core* bzw. *Target* Läsionen, zeigte sich in der Aktin Färbung eine auf die zentralen Anteile der *Target* Läsionen beschränkte Immunreaktion, während in den *Core* Läsionen auch die peripheren Anteile eine verstärkte Aktin Färbung aufwiesen.

Eine Behandlung von unfixiertem Muskelgewebe mit Natriumthiozyanat führt zu einer Degradation und Entfernung von Aktin-Filamenten aus dem Gewebe. Eine entsprechende Behandlung der Muskelschnitte von drei Patienten mit *Central-Core-Myopathie*, einem Patienten mit *Minicore-Myopathie* sowie von fünf Patienten mit neurogenen Gewebssyndromen (Biopsate mit zahlreichen *Targetfasern*), führte erwartungsgemäß zu einer drastischen Reduktion der Aktin-

Immunreaktion innerhalb der *Core* bzw. *Target* Läsionen sowie den diese Läsionen umgebenden Zytoplasmaarealen (Abb. 4F, 5F und 6F). Im Gegensatz hierzu zeigte sich in den α BC und Desmin Färbungen eine Akzentuierung der Immunreaktion in zytoplasmatischen und *Core* bzw. *Target* Läsionen nach dieser Behandlung (Abb. 4B, 4D, 5B, 5D, 6B und 6D).

Um zu überprüfen, ob die verstärkte α BC Färbereaktion in *Central-Core-Myopathien* und *Minicore-Myopathien* bzw. in den neurogenen Gewebssyndromen auch mit einer Zunahme der α BC Expression bei diesen Krankheitsentitäten einhergeht, wurde in einem nächsten Schritt eine α BC Western Blot Analyse mit Gesamtproteinextrakt aus einer *Central-Core-Myopathie*, einer *Minicore-Myopathie* und aus einer Muskelbiopsie eines neurogenen Gewebssyndroms durchgeführt. Im Vergleich zu Normalkontrollen ließ sich hier jedoch keine detektierbare quantitative Änderung von α BC nachweisen (Abb. 7).

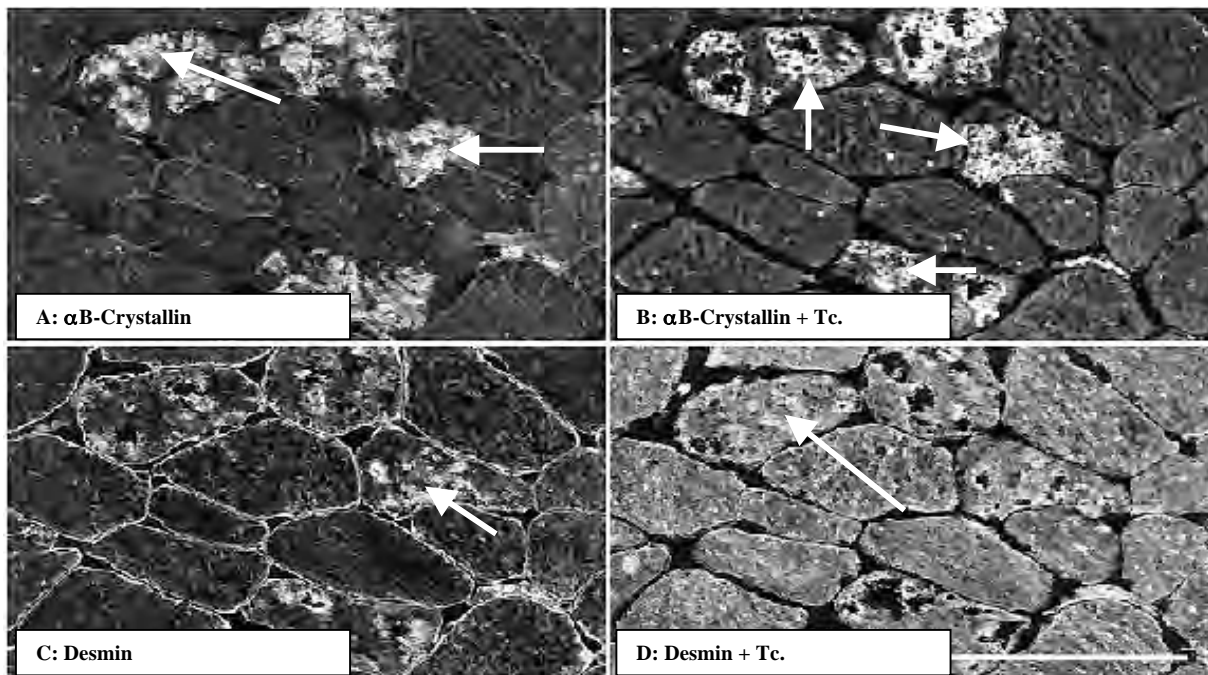


Abb. 4A-D:

Indirekte Immunfluoreszenz Analyse einer Muskelbiopsie eines Pat. mit *Minicore-Myopathie*. Alle *Core* Strukturen zeigen eine starke Immunreaktion mit dem TXR markierten Antikörper gegen α BC (4A) und mit dem FITC markierten Antikörper gegen Desmin (4C). Nach Thiozyanat induzierter Aktinfilamentdegradation sieht man eine verstärkte α BC-Färbung der *Core* Strukturen (4B). Generell erscheint auch das Zytoplasma eine verstärkte Desminreaktion nach der Thiozyanat-Behandlung aufzuweisen. Skalierungsbalken = 100 μ m.

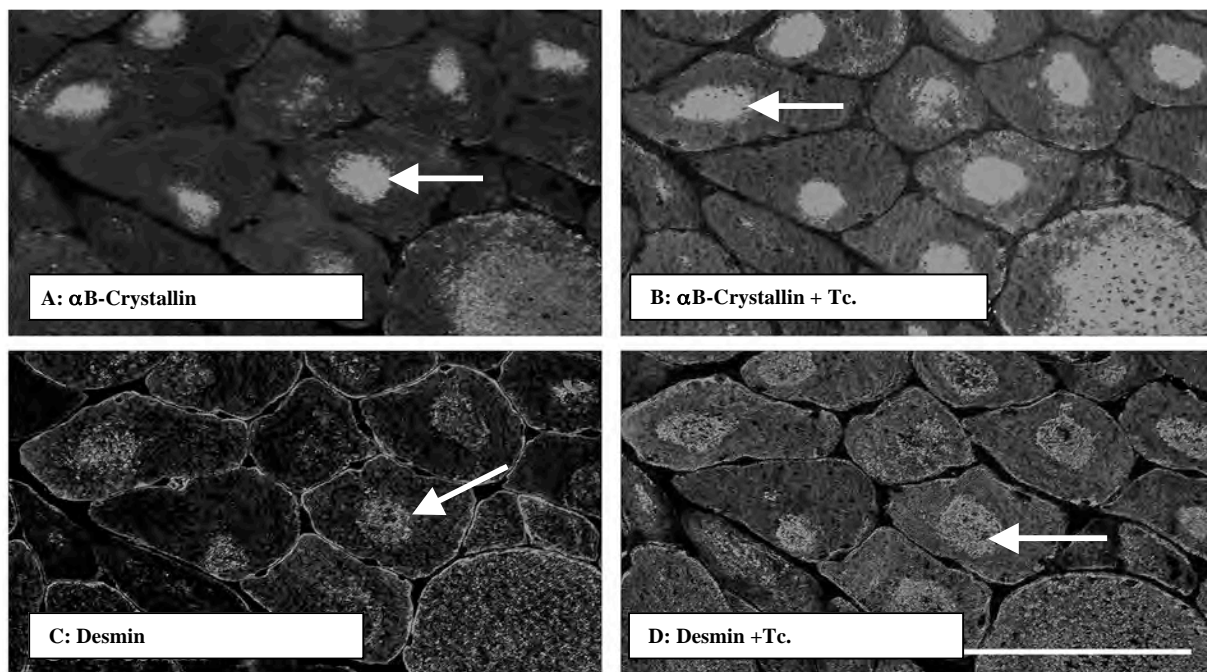


Abb. 5A-D:

Immunfluoreszenz Analysen von einer Muskelbiopsie von einem Pat. mit einer *Central-Core-Myopathie*. Die zentralen Zonen der *Core* Strukturen zeigen mit Antikörpern gegen α BC (5A) und Desmin (5C) eine starke Immunreaktion (siehe Pfeilmarkierung). Thiozyanatbehandlung führt zu einer Zunahme der Signalintensität von α BC (5C) und Desmin im Zytoplasma und im Bereich der *Core* Strukturen (5D). Skalierungsbalken = 100 μ m.

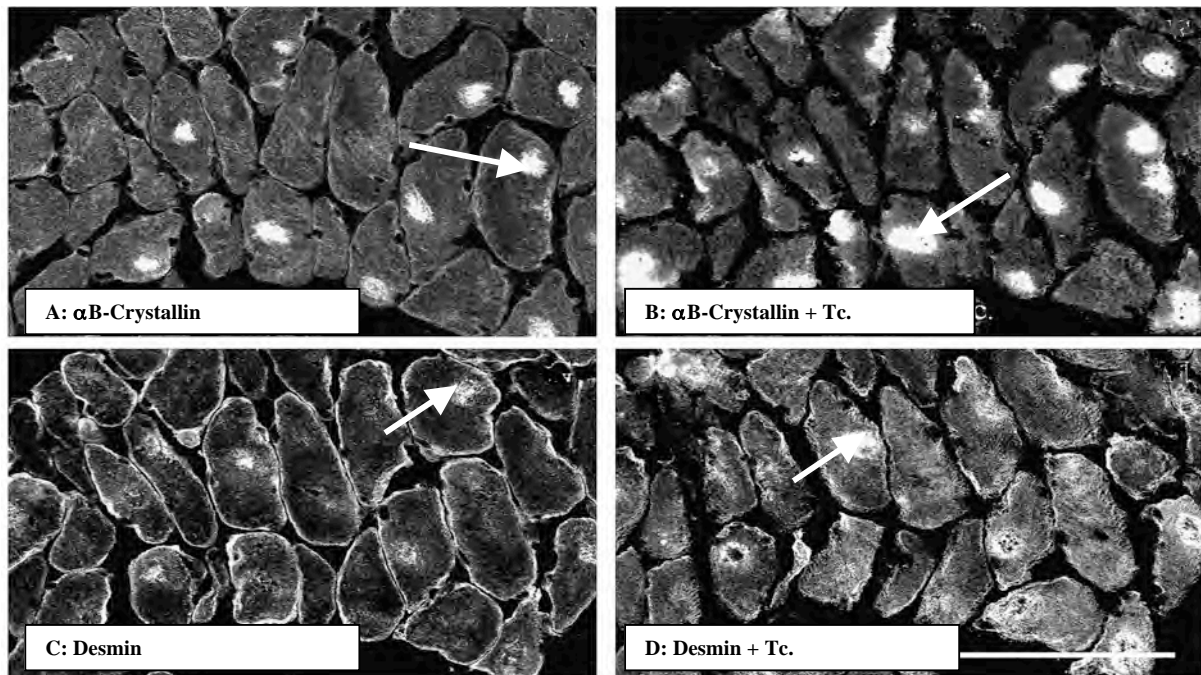


Abb. 6A-D:

Immunfluoreszenz Analyse von einer Muskelbiopsie von einem Pat. mit neurogenem Gewebssyndrom (amyotrophe Lateralsklerose). Die Abb. zeigt eine deutliche Immunreaktion der, mit Antikörpern gegen αBC (6A) und Desmin (6C) markierten, *Targetfasern*. Die Thiozyanatbehandlung zeigt auch hier eine sichtbare Zunahme der Signalintensität für αBC (6B) und Desmin (6D) (siehe Pfeilmarkierung). Skalierungsbalken = 100μm

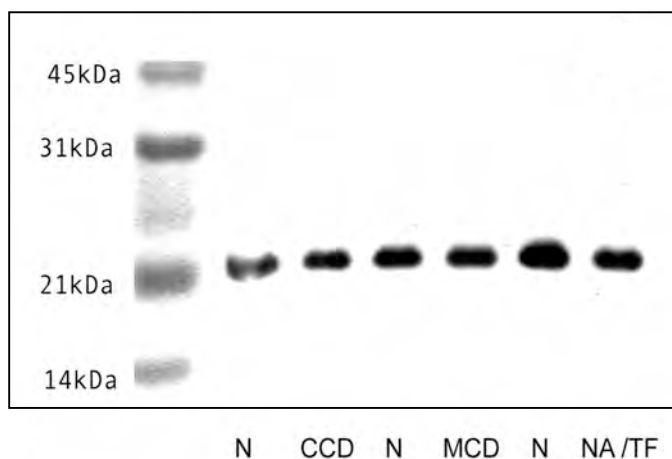


Abb. 7:

αBC Western Blot Analyse aus Gesamtproteinextrakten von normaler adulter Skelettmuskulatur (N), *Central-Core-Myopathie* (CCD), *Minicore Myopathie* (MCD) und einer neurogenen Atrophie (NA) mit multiplen *Targetfasern* (TF). Eine signifikante Veränderung der αBC-Expression lässt sich bei den untersuchten Krankheitsentitäten nicht nachweisen.

4.1.4. Lokalisation und Expression von HSP27 in kongenitalen Myopathien und neurogenen Gewebssyndromen

In den Muskelbiopsien der 19 Patienten mit verschiedenen kongenitalen Myopathien und neurogenen Gewebssyndromen (*Central-Core-Myopathie*, *Minicore-Myopathie*, *Nemaline-Myopathie*, *Myopathie mit tubulären Aggregaten und NA/TA*) wurde ferner die Lokalisation und Expression von HSP27 untersucht. In Analogie zu den Befunden mit dem α BC-Antikörper zeigten die hier durchgeführten Analysen eine Anfärbung des Zytoplasmas der Muskelfasern sowie eine deutliche Akzentuierung der HSP27 Immunreaktion innerhalb der *Core-* und *Minicore* Strukturen sowie der *Targetfasern* (Abb. 8C, 9C und 10C). Eine positive Reaktion mit *Nemaline-Körperchen* bzw. *tubulären Aggregaten* ließen sich hingegen nicht dokumentieren. Eine Assoziation von HSP27 zu Mikrofilamenten konnte durch die Vorbehandlung nativer Muskelbiopsate mit dem Reduktionsmittel Natriumthiozyanat gezeigt werden. Natriumthiozyanat degradiert Aktinmikrofilamente und führt nach einer Anfärbung mit einem spezifischen Ak gegen Aktin (Abb. 8B, 9B und 10B) zu einer deutlichen Abschwächung der Signalintensität. Die parallel gemachten Färbungen mit HSP27 zeigten hier ebenfalls eine deutliche Signalreduktion (Abb. 8D, 9D und 10D). Um eine eventuelle Überexpression von HSP27 in den verschiedenen Entitäten nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dabei konnte keine Überexpression in den pathologisch veränderten Muskelgesamtextrakten im Vergleich zu Extrakten aus normaler adulter Skelettmuskulatur nachgewiesen werden (Abb. 11).

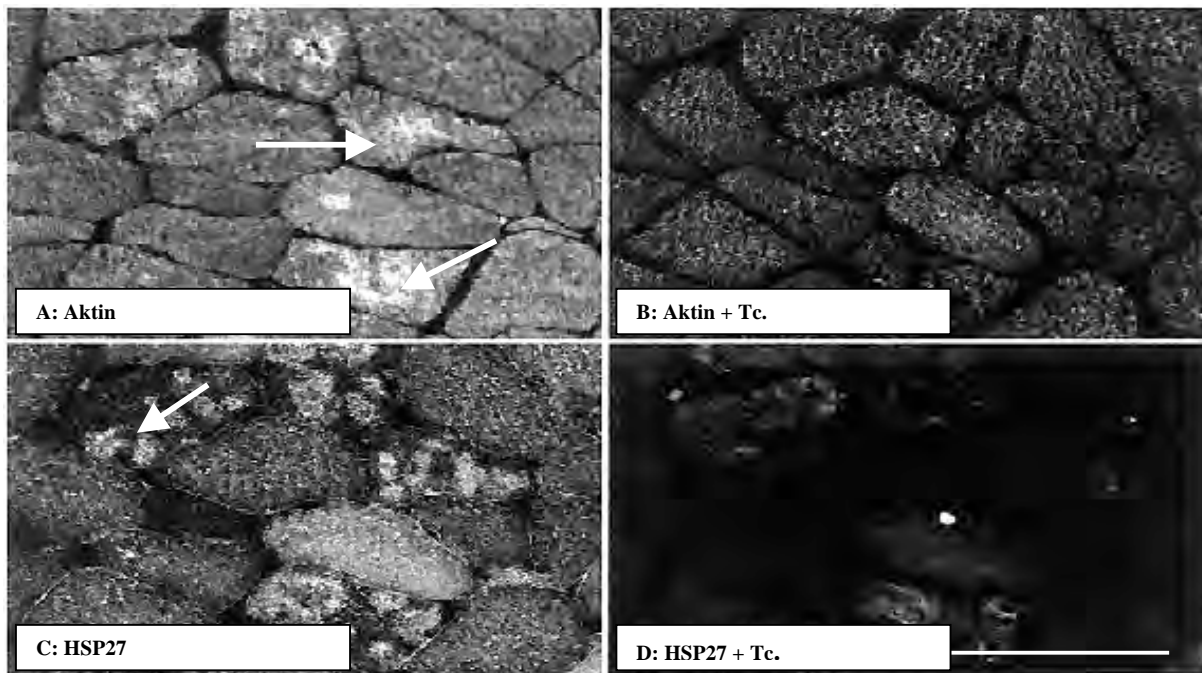


Abb. 8A-D:

Immunfluoreszenz Analysen einer Muskelbiopsie von einem Pat. mit *Minicore-Myopathie*. Sämtliche *Core* Strukturen zeigen nach Färbung mit TXR/ FITC markierten Antikörpern gegen Aktin (8A) und HSP27 (8C) eine deutliche Immunreaktion (siehe Pfeilmarkierung). Nach Behandlung mit Thiozyanat sind die *Core* Strukturen mit Ak gegen Aktin (8B) und HSP27 (8D) nicht mehr nachweisbar. Skalierungsbalken = 100µm.

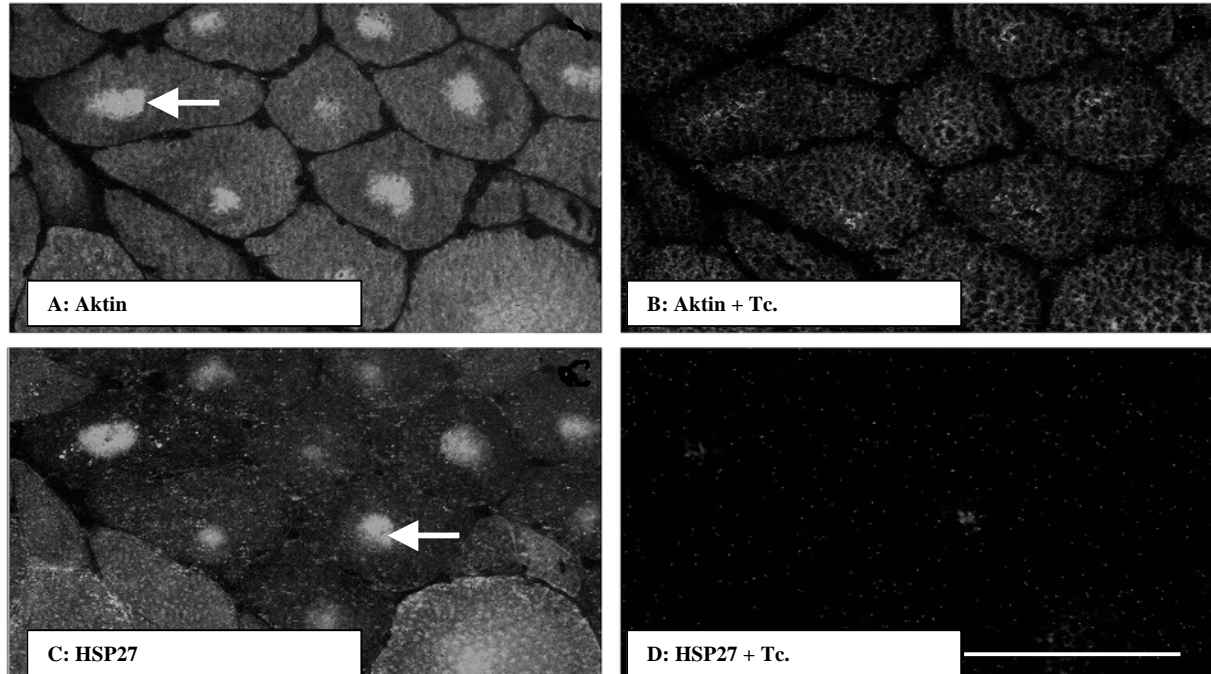


Abb. 9A-D:

Immunfluoreszenz Analysen einer Muskelbiopsie von einem Pat. mit *Central-Core-Myopathie*. Die zentral gelegenen *Core* Strukturen zeigen eine deutliche Signalintensität nach Anfärbung mit Ak gegen Aktin (9A) und HSP27 (9C) (siehe Pfeilmarkierung). Nach der durchgeführten Thiozyanatbehandlung sind keine spezifischen Anfärbungen innerhalb der *Core* Strukturen mit Ak gegen Aktin (9B) oder HSP27 (9D) zu beobachten. Skalierungsbalken = 100µm.

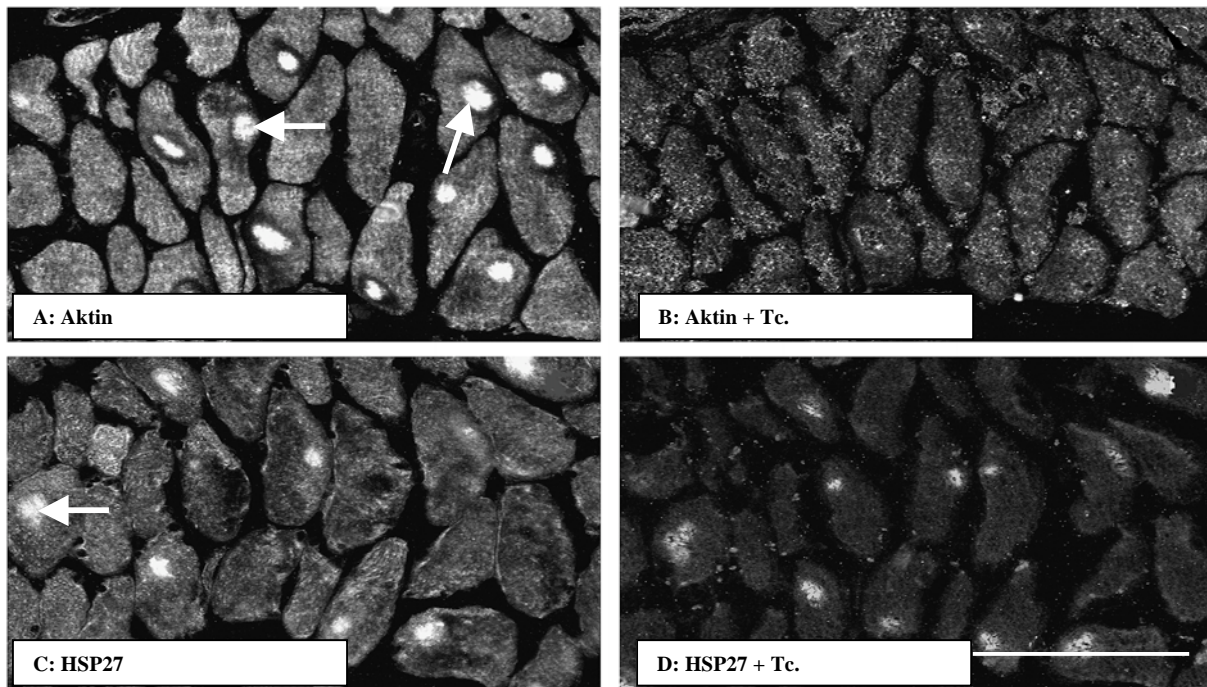


Abb. 10A-D:

Immunfluoreszenz Analyse einer Muskelbiopsie von einem Pat. mit amyotropher Lateralsklerose. Die charakteristischen *Targetfasern* sind nach Färbung mit Ak gegen Aktin (10A) und HSP27 (10C) deutlich sichtbar (siehe Pfeilmarkierung). Die Behandlung der Biopsie mit Thiozyanat führt zu einem Signalverlust nach Färbung mit Aktin (10B) und zu einer deutlich reduzierten Abnahme des Signals bei Färbung mit HSP27 (10D). Skalierungsbalken = 100µm

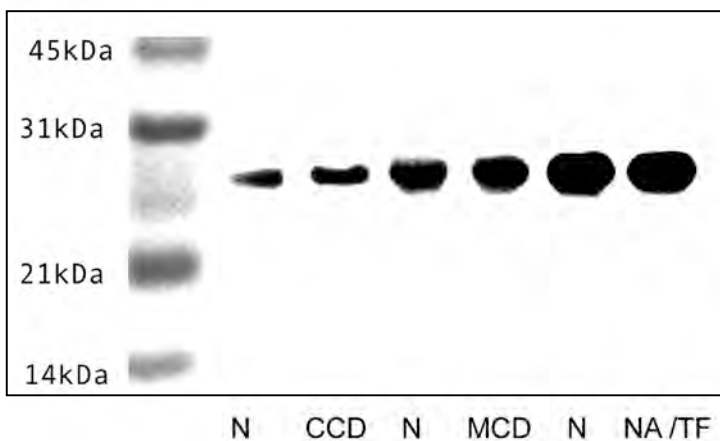


Abb. 11:

Western Blot Analyse von HSP27. In allen Extrakten erhält man eine spezifische, singuläre Bande zwischen 21 und 31 kDa, die dem ungefähren Molekulargewicht von HSP27 entspricht. In keinem der pathologischen Korrelate konnte eine Überexpression auf Proteinebene nachgewiesen werden (N=Normale Skelettmuskulatur, CCD= Central-Core-Myopathie, MCD= Minicore-Myopathie, NA/TF= Neurogene Atrophie mit *Targetfasern*).

5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Expression und das immunhistochemische Reaktionsmuster der kleinen HSPs α BC und HSP27 bei kongenitalen Myopathien und neurogenen Gewebssyndromen untersucht. Die Western-Blot Analyse von Gesamtproteinextrakten aus normalem humanem Skelettmuskelgewebe erbrachte mit dem Antikörper gegen α BC die spezifische Detektion einer singulären Bande mit einem MG von 21 kDa und mit dem Antikörper gegen HSP27 eine Immunmarkierung einer 27 kDa Bande. Diese Befunde zeigen zum einen die Spezifität der hier verwendeten Ak und belegen eine basale Expression dieser beiden sHSPs in der normalen humanen Skelettmuskulatur. Die immunhistochemische Analyse von normalem humanem Skelettmuskelgewebe zeigte mit Antikörpern gegen α BC und HSP27 ein schwaches auf das Sarkoplasma der Muskelfasern beschränktes Anfärbemuster. Muskelfaserkerne bzw. endo- oder perimyoseale Bindegewebsstrukturen zeigten hingegen keine spezifische Immunreaktion.

Als immunhistochemische Hauptbefunde bei den krankhaft veränderten Gewebeproben konnte gezeigt werden, dass beide kleinen HSPs ein verändertes Anfärbemuster bei den *Central-Core*- und *Minicore-Myopathien* sowie den neurogenen Gewebssyndromen aufweisen. Zusätzlich zu der in normalen Skelettmuskelbiopsien beobachteten schwachen sarkoplasmatischen Anfärbung zeigte die Untersuchung der Skelettmuskelprobe des Patienten mit der *Minicore-Myopathie* eine deutlich verstärkte Immunfärbung der multiplen *Minicore* Läsionen. Eine verstärkte Immunreaktion der sogenannten *Core* Läsionen ließ sich bei drei der fünf untersuchten *Central-Core-Myopathien* und in den *Target* Läsionen der neurogenen Gewebssyndrome nachweisen. Ein verstärktes immunhistochemisches Anfärbemuster der *Minicore*, *Central-Core* und *Target* Läsionen zeigte sich auch mit den Ak-Färbungen gegen Desmin und Aktin. Der genetische Defekt bei den in dieser Arbeit untersuchten *Central-Core*- und *Minicore-Myopathien* ist bis dato nicht aufgeklärt. Für die *Minicore-Myopathie* konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass ein Teil der vererblichen Fälle durch Selenoprotein N (SEPN1) Mutationen auf Chromosom 1p36-35 bedingt sind (Ferreiro et al., 2002). Weitere genetische Ursachen für diese extrem seltene kongenitale Myopathie sind Mutationen des Ryanodin Rezeptor 1 (RYR1) Gens auf Chromosom 19q13.1 (Jungbluth et al., 2002). Für die autosomal dominanten wie auch rezessiven Formen der *Central-Core-Myopathie* wurden ebenfalls zahlreiche pathogene Mutationen des Ryanodin Rezeptor 1 (RYR1) Gens auf Chromosom 19q13.1 beschrieben (Treves et al., 2005). Unterschiedliche genetische Defekte bei den von uns untersuchten *Central-Core-Myopathien*

sind somit eine der möglichen Erklärungen für die Beobachtung, dass nur drei der fünf *Central-Core-Myopathien* eine vermehrte α BC/ HSP27 Anfärbung der Core Läsionen zeigten.

Bezüglich der Funktionalität von α BC und HSP27 wurde eine bevorzugte Assoziation von α BC mit Desmin-Intermediärfilamenten und HSP27 mit dem Aktinmikrofilamentsystem beschrieben (Bennardini et al., 1992). Um diesen Punkt bei den *Central-Core-Myopathien* und *Minicore-Myopathien* und den neurogenen Gewebssyndromen weiter zu analysieren, wurden diese Gewebeproben mit Natriumthiocyanat behandelt. Diese Behandlung mit Natriumthiocyanat führt zu einer Degradation und damit fast vollständigen Entfernung der Aktinfilamente aus dem Muskelgewebe (Fischer et al., 2002). Dieser dramatische Effekt der Natriumthiocyanat Behandlung konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aktin Immunfärbungen an normalen und pathologischen Gewebeproben eindrucksvoll demonstriert werden. Die verminderte Aktin Immunreaktion war hierbei auch von einer deutlich verminderten HSP27 Immunreaktion des Sarkoplasmas sowie der *Minicore*, *Central-Core* und *Target* Läsionen begleitet. Im Gegensatz hierzu zeigte sich mit den Ak gegen α BC und Desmin eine verstärkte Immunanfärbung der *Core* und *Target* Läsionen sowie des diese Strukturen umgebenden Sarkoplasmas. Diese Befundkonstellation unterstreicht weiter die biochemischen Daten, die α BC funktionell eher dem Desmin Filament System zuordnen, während HSP27 eher dem Aktin Filament System zugeordnet wird.

In einem nächsten Schritt wurde mittels Western blotting analysiert, ob die fokale verstärkte α BC und HSP27 Immunfärbung bei der *Minicore-Myopathie*, bei den drei *Central-Core-Myopathien* und den neurogenen Gewebssyndromen durch eine vermehrte α BC/ HSP27 Expression bedingt war. Die hier durchgeführten Analysen zeigten jedoch eine zu Normalgewebe identische Signalstärke der spezifisch detektierten α BC und HSP27 Bande. Im Bezug auf die Gesamtexpression der beiden sHSPs ließ sich somit kein eindeutig abweichendes Expressionsmuster nachweisen. Kritisch ist hierbei anzumerken, dass eventuell vorliegende Abweichungen auf der Einzelfaserebene durch die Western Blot Analyse an Gesamtproteinextrakten nicht erfasst werden. Unter Einbeziehung der Natriumthiocyanat-Daten erscheint es jedoch eher wahrscheinlich, dass die lokalen Auflösungen der Myofibrillen-Strukturen bei *Minicore*, *Central-Core* und *Target* Läsionen zu einer verbesserten Zugänglichkeit der Antikörper zu den jeweiligen α BC und HSP27 Epitopen führen. Die funktionelle Bedeutung der hier beobachteten Phänomene bleibt derzeit gänzlich unklar.

Im Hinblick auf die myopathologische Diagnostik lässt sich festhalten, dass die α BC und HSP27 Antikörper als sensitive Marker für die Detektion von *Minicore*, *Central-Core* und *Target* Läsionen eingesetzt werden können. Beide sHSPs sind für diese Formen der sarkoplasmatischen Strukturstörungen jedoch nicht spezifisch. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass α BC Antikörper zytoplasmatische Proteinaggregate bei der *Desminopathie* und der *α B-Crystallinopathie* anfärben (Goebel und Warlo, 2000; Goldfarb et al., 1998; Vicart et al., 1998). Bei der sporadischen Einschlusskörper-Myositis wurde gezeigt, dass multiple strukturell veränderte und strukturell normal erscheinende Muskelfasern eine vermehrte α BC Anfärbung aufweisen (Banwell und Engel, 2000; Brady et al., 1997). Folgestudien der letzten Jahre zeigten weiterhin, dass zytoplasmatische Proteinaggregationen bei verschiedenen Formen von myofibrillären Myopathien auf der Basis von Myotilin, ZASP und Filamin C eine vermehrte α BC und HSP27 Immunreaktion zeigen (Fischer et al., 2006; Kley et al., 2007; Schröder et al., 2007). In Analogie zu den in dieser Arbeit erhobenen Western Blot Befunden konnte auch bei den verschiedenen genetischen Formen der Proteinaggregationsmyopathien keine detektierbare Änderung des Expressionsniveaus von α BC/ HSP27 nachgewiesen werden (Clemen et al., 2005).

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und das immunhistochemische Färbeverhalten von α BC und HSP27 an normalem humanem Skelettmuskelgewebe und bei verschiedenen kongenitalen Myopathien und neurogenen Gewebssyndromen untersucht. Die verwendeten α BC und HSP27 Antikörper zeigten in der immunhistochemischen Analyse von normalem Skelettmuskelgewebe beide eine schwache Anfärbung des Sarkoplasmas der Muskelfasern. Ein hiervon abweichendes Anfärbemuster zeigte sich bei drei der fünf untersuchten *Central-Core-Myopathien*, bei einer *Minicore-Myopathie* sowie an fünf untersuchten neurogenen Gewebssyndromen. Zusätzlich zu der schwachen sarkoplasmatischen Anfärbung zeigte sich bei all diesen pathologischen Gewebeproben eine deutlich verstärkte α BC/HSP27 Immunreaktion der für diese Entitäten typischen *Central-Core* und *Minicore* Läsionen sowie der *Target* Läsionen. Im Gegensatz hierzu zeigten die fünf untersuchten *Nemaline-Myopathien* sowie die drei untersuchten *Myopathien mit tubulären Aggregaten* lediglich das bei Normalkontrollen beobachtete sarkoplasmatische Anfärbemuster und keine spezifische Färbereaktion der *Nemaline Körperchen* bzw. der *tubulären Aggregate*. Die weiterführenden WB Analysen von ausgewählten Fällen mit *Central-Core-Myopathie*, *Minicore-Myopathie* und neurogenen Gewebssyndromen zeigten im Vergleich zum normalen Muskel unveränderte Mengen von α BC und HSP27. Die Gesamtheit der erhobenen Befunde sprechen dafür, dass Antikörper gegen α BC und HSP27 sensitive diagnostische Marker für die Detektion von *Central-Core*, *Minicore* und *Target* Läsionen sind. Spezifisch für diese Strukturstörungen sind beide jedoch nicht, da verstärkte α BC und HSP27 Immunfärbungen auch bei anderen Muskelerkrankungen mit myofibrillären Strukturstörungen und pathologischen Proteinaggregaten beschrieben wurden.

7. Literaturverzeichnis

- Atomi Y, Yamada S, Strohman R, Nonomura Y. Alpha B-crystallin in skeletal muscle: purification and localization. *J Biochem* 1991; 110: 812–822
- Banwell BL, Engel AG. AlphaB-crystallin immunolocalization yields new insights into inclusion body myositis. *Neurology* 2000; 54: 1033–1041
- Bennardini F, Wrzosek A, Chiesi M. Alpha B-crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments. *Circ Res* 1992; 71: 288-294
- Benndorf R, Hayess K, Ryazantsev S, Wieske M, Behlke J, Lutsch G. Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J Biol Chem* 1994; 269: 20780-20784
- Bhat SP, Nagineni CN. alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 319-325
- Boelens WC, de Jong WW. alpha-Crystallins, versatile stress-proteins. *Mol Biol Rep* 1995; 21: 75-80
- Bova MP, Yaron O, Huang Q, Ding L, Haley DA, Stewart PL, Horwitz J. Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6137–6142
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
- Brady JP, Garland D, Duglas-Tabor Y, Robison WG Jr, Groome A, Wawrousek EF. Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 884-889

Carter JM, Hutcheson AM, Quinlan RA. In vitro studies on the assembly properties of the lens proteins CP49, CP115 coassembly with alpha-crystallin but not with vimentin. *Exp Eye Res* 1995; 60: 181-192

Ciocca DR, Luque EH. Immunological evidence for the identity between the hsp27 estrogen-regulated heat shock protein and the p29 estrogen receptor-associated protein in breast and endometrial cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 20: 33-42

Clark JI, Muchowski PJ. Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10: 52-59

Clemen CS, Fischer D, Roth U, Simon S, Vicart P, Kato K, Kaminska AM, Vorgerd M, Goldfarb LG, Eymard B, Romero NB, Goudeau B, Eggermann T, Zerres K, Noegel AA, Schroder R. Hsp27-2D-gel electrophoresis is a diagnostic tool to differentiate primary desminopathies from myofibrillar myopathies. *FEBS Lett* 2005; 579: 3777-3782

Craig EA, Weissman JS, Horwich AL. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 1994; 78: 365-372

Das KP, Surewicz WK. Temperature-induced exposure of hydrophobic surfaces and its effect on the chaperone activity of alpha-crystallin. *FEBS Lett* 1995; 369: 321-325

De Bleecker JL, Ertl BB, Engel AG. Patterns of abnormal protein expression in target formations and unstructured cores. *Neuromuscul Disord* 1996; 6: 339-349

Dubowitz V. Pathological changes in muscle biopsies. In: Dubowitz V (ed) *Muscle biopsy: a practical approach*, 1985 2nd edn. Baillière Tindall, Eastbourne: 113-128

Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, Buchner J. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J* 1997; 16: 221-229

Ellis RJ. The molecular chaperone concept. *Semin Cell Bio* 1990; 1: 1–9

[Ellis RJ, van der Vies SM](#). Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 321-347

Evgrafov OV, Mersiyanova I, Irobi J, Van Den Bosch L, Dierick I, Leung CL, Schagina O, Verpoorten N, Van Impe K, Fedotov V, Dadali E, Auer-Grumbach M, Windpassinger C, Wagner K, Mitrovic Z, Hilton-Jones D, Talbot K, Martin JJ, Vasserman N, Tverskaya S, Polyakov A, Liem RK, Gettemans J, Robberecht W, De Jonghe P, Timmerman V. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet* 2004; 36: 602-606

Ferreiro A, Quijano-Roy S, Pichereau C, Moghadaszadeh B, Goemans N, Bonnemann C, Jungbluth H, Straub V, Villanova M, Leroy JP, Romero NB, Martin JJ, Muntoni F, Voit T, Estournet B, Richard P, Fardeau M, Guicheney P. [Mutations](#) of the selenoprotein N [gene](#), which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical [phenotype](#) of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 739-749

[Fischer D, Matten J, Reimann J, Bönemann C, Schröder R](#). Expression, localization and functional divergence of alphaB-crystallin and heat shock protein 27 in core myopathies and neurogenic atrophy. *Acta Neuropathol* 2002; 104: 297-304

Fischer D, Clemen CS, Olive M, Ferrer I, Goudeau B, Roth U, Badorf P, Wattjes MP, Lutterbey G, Kral T, van der Ven PF, Furst DO, Vicart P, Goldfarb LG, Moza M, Carpen O, Reichelt J, Schröder R. Different early pathogenesis in myotilinopathy compared to primary desminopathy. *Neuromuscul Disord* 2006;16: 361-367

[Fuqua SA, Blum-Salingaros M, McGuire WL](#). Induction of the estrogen-regulated "24K" protein by heat shock. *Cancer Res* 1989; 49: 4126-4129

Gaestel M, Gotthardt R, Muller T. Structure and organisation of a murine gene encoding small heat-shock protein Hsp25. *Gene* 1993; 128: 279-283

Goebel HH, Warlo I. Gene-related protein surplus myopathies. *Mol Genet* 2000; 71: 267–275

Goldfarb LG, Park KY, Cervenakova L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, Nagle JW, Semino-Mora C, Sivakumar K, Dalakas MC. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* 1998; 19: 402–403

Golenhofen N, Arbeiter A, Koob R, Drenckhahn D. Ischemia-induced association of the stress protein alpha B-crystallin with I-band portion of cardiac titin. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 309–319

Golenhofen N, Ness W, Koob R, Htun P, Schaper W, Drenckhahn D. Ischemia-induced phosphorylation and translocation of stress protein alpha B-crystallin to Z lines of myocardium. *Am J Physiol* 1998; 274: 1457–1464

Görg A, Boguth G, Obermaier C, Posch A, Weiss W. Two-dimensional polyacryl-amide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): The state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* 1995; 16: 1079-1086

Graw J. The crystallins: genes, proteins and diseases. *Biol Chem* 1997; 378: 1331–1348

Groenen PJ, Merck KB, de Jong WW, Bloemendal H. Structure and modifications of the junior chaperone alpha-crystallin. From lens transparency to molecular pathology. *Eur J Biochem* 1994; 225: 1-19

[Gurley WB, Key JL](#). Transcriptional regulation of the heat-shock response: a plant perspective. *Biochemistry* 1991; 30: 1-12

Head MW, Corbin E, Goldman JE. Coordinate and independent regulation of alpha B-crystallin and hsp27 expression in response to physiological stress. *J Cell Physiol* 1994; 159: 41–50

Hickey E, Brandon SE, Potter R, Stein G, Stein J, Weber LA. Sequence and organization of genes encoding the human 27 kDa heat shock protein. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 4127-4145

Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 10449-1053

Huot J, Roy G, Lambert H, Chretien P, Landry J. Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer Res* 1991; 51:5245-5252

Inagaki N, Hayashi T, Arimura T, Koga Y, Takahashi M, Shibata H, Teraoka K, Chikamori T, Yamashina A, Kimura A. Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 379-386

Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y, Tsuzuki M, Kishikawa M, Shimada A, Hosokawa M, Kato K. Hsp27 suppresses the formation of inclusion bodies induced by expression of R120G alpha B-crystallin, a cause of desmin-related myopathy. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1217-1223

Iwaki T, Wisniewski T, Iwaki A, Corbin E, Tomokane N, Tateishi J, Goldman JE. Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. *Am J Pathol* 1992; 140: 345-356

Jungbluth H, Muller CR, Halliger-Keller B, Brockington M, Brown SC, Feng L, Chattopadhyay A, Mercuri E, Manzur AY, Ferreira A, Laing NG, Davis MR, Roper HP, Dubowitz V, Bydder G, Sewry CA, Muntoni F. Autosomal recessive inheritance of RYR1 mutations in a congenital myopathy with cores. *Neurology* 2002; 59: 284-287

Kantorow M, Horwitz J, van Boekel MA, de Jong WW, Piatigorsky J. Conversion from oligomers to tetramers enhances autophosphorylation by lens alpha A-crystallin. Specificity between alpha A- and alpha B-crystallin subunits. *J Biol Chem* 1995; 270: 17215-17220

Kato K, Hasegawa K, Goto S, Inaguma Y. Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *J Biol Chem* 1994; 269: 11274-11278

Kato K, Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y. Innervation-dependent phosphorylation and accumulation of alphaB-crystallin and Hsp27 as insoluble complexes in disused muscle. *ASEB J* 2002; 16: 1432-1434

Klemenz R, Frohli E, Steiger RH, Schafer R, Aoyama A. Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 3652-3656

[Kley RA, Hellenbroich Y, van der Ven PF, Fürst DO, Huebner A, Bruchertseifer V, Peters SA, Heyer CM, Kirschner J, Schröder R, Fischer D, Müller K, Tolksdorf K, Eger K, Germing A, Brodherr T, Reum C, Walter MC, Lochmüller H, Ketelsen UP, Vorgerd M.](#)

Clinical and morphological phenotype of the filamin myopathy: a study of 31 German patients. *Brain* 2007; 130: 3250-3264

[Laemmli UK.](#) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

Landry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Anderson CW. Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem* 1992; 267: 794-780

Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* 1993; 268: 24210-24214

Liang P, MacRae TH. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci* 1997; 110: 1431-1440

[Lindquist S, Craig EA.](#) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631-677

Macario AJ, Conway DM. Stress and molecular chaperones in disease. *Int J Clin Lab Res* 2000; 30: 49–66

MacRae TH. Structure and function of small heat shock/ alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 899–913

Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz R, Arrigo AP. Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J Immunol* 1995; 154: 363-374

[Morimoto RI](#). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998; 12: 3788-3796

Nedellec P, Edling Y, Perret E, Fardeau M, Vicart P. Glucocorticoid treatment induces expression of small heat shock proteins in human satellite cell populations: consequences for a desmin-related myopathy involving the R120G alpha B-crystallin mutation. *Neuromuscul Disord* 2002; 12: 457-465

Neufer PD, Benjamin IJ. Differential expression of alpha B-crystallin and Hsp27 in skeletal muscle during continuous contractile activity. Relationship to myogenic regulatory factors. *J Biol Chem* 1996; 271: 24089-24095

Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 1993; 27: 437–496

Perng MD, Cairns L, van den IJssel P, Prescott A, Hutcheson AM, Quinlan RA. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alpha B-crystallin. *J Cell Sci* 1999; 112: 2099-2112

Pinder SE, Balsitis M, Ellis IO, Landon M, Mayer RJ, Lowe J. The expression of alpha B-crystallin in epithelial tumours: a useful tumour marker? *J Pathol* 1994; 174: 209-215

Raman B, Rao CM. Chaperone-like activity and quaternary structure of alpha-crystallin. *J Biol Chem* 1994; 269: 27264-27268

[Sarge KD](#). Regulation of HSF1 activation and Hsp expression in mouse tissues under physiological stress conditions. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 851: 112-116

Sax CM, Piatigorsky J. Expression of the alpha-crystallin/small heat-shock protein/molecular chaperone genes in the lens and other tissues. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1994; 69: 155-201

[Schröder R](#), [Vrabie A](#), [Goebel HH](#). Primary desminopathies. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 416-426

Schröder R, Mundegar RR, Treusch M, Schlegel U, Blumcke I, Owaribe K, Magin TM. Altered distribution of plectin/ HD1 in dystrophinopathies. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 165–171

Schröder R, Warlo I, Herrmann H, Ven PF van der, Klasen C, Blumcke I, Mundegar RR, Furst DO, Goebel HH, Magin TM. Immunogold EM reveals a close association of plectin and the desmin cytoskeleton in human skeletal muscle. *Eur J Cell Biol* 1999; 78: 288–295

Schlesinger MJ. How the cell copes with stress and the function of heat shock proteins. *Pediatr Res* 1994; 36: 1-6

[Schubert W](#), [Kontozis L](#), [Sticker G](#), [Schwan H](#), [Haraldsen G](#), [Jerusalem F](#). Immunofluorescent evidence for presence of interleukin-1 in normal and diseased human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 1988; 11: 890-892

Selcen D, Engel AG. Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations. *Ann Neurol* 2003; 54: 804-810

Selcen D, Engel AG. Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology* 2004; 62: 1363-1371

Sun Y, MacRae TH. The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J* 2005; 272: 2613-2627

Tanguay RM. Transcriptional activation of heat-shock genes in eukaryotes. *Biochem Cell Biol* 1988; 66: 584-593

Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 1974; 84: 389-398

Treves S, Anderson AA, Ducreux S, Divet A, Bleunven C, Grasso C, Paesante S, Zorzato F. Ryanodine receptor 1 mutations, dysregulation of calcium homeostasis and neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord* 2005; 15: 577-587

van den IJssel PR, Overkamp P, Bloemendal H, de Jong WW. Phosphorylation of alphaB-crystallin and HSP27 is induced by similar stressors in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 518-523

Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 1998; 20: 92-95

Wanschit J, Nakano S, Goudeau B, Ströbel T, Rinner W, Wimmer G, Resch H, Jaksch M, Akiguchi I, Vicart P, Budka H. Myofibrillar (desmin-related) myopathy: clinico-pathological spectrum in 3 cases and review of the literature. *Clin Neuropathol* 2002; 21: 220-231

Welsh MJ, Gaestel M. Small heat-shock protein family: function in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 851: 28-35

Zhou H, Yamaguchi N, Xu L, Wang Y, Sewry C, Jungbluth H, Zorzato F, Bertini E, Muntoni F, Meissner G, Treves S. Characterization of [recessive](#) RYR1 [mutations](#) in core myopathies. Hum Mol Genet 2006; 15: 2791-2803

9. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Rolf Schröder danke ich für das Überlassen dieser Arbeit sowie die umfangreiche Betreuung.

Karin Kappeshorn und Manuela Stepin-Mering aus dem Muskellabor der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Direktor: Professor Dr. med. Thomas Klockgether) danke ich für die stets hilfreichen und umfangreichen technischen Hilfestellungen.

Promotionsrelevante eigene Veröffentlichungen

Fischer D, Matten J, Reimann J, Bönnemann C, Schröder R. Expression and functional divergence of α BC and heat shock protein 27 in core myopathies and neurogenic atrophy.

Acta Neuropathologica 2002; 104: 297- 304

Promotionsrelevante eigene Kongressbeiträge

Fischer D, Matten J, Reimann J, Bönnemann C, Schröder R. Expression, localization and functional divergence of alpha-B-crystallin and heat shock protein 27 in core myopathies and neurogenic atrophy. Journal of the Neurological Sciences 2002; 199(S1): 17